

(127)

(1570) 00964257C

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 35 17 456 A1**

⑤1 Int. Cl. 4:
A61 L 27/00

②1 Aktenzeichen: P 35 17 456.0
②2 Anmeldetag: 14. 5. 85
④3 Offenlegungstag: 20. 11. 86

Behördeneigentlich

DE 35 17 456 A1

⑦1 Anmelder:
Serapharm GmbH & Co KG, 4400 Münster, DE

⑦4 Vertreter:
Tischer, H., Dipl.-Ing.; Kern, W., Dipl.-Ing.; Brehm,
H., Dipl.-Chem. Dr.phil.nat., Pat.-Anw., 8000
München

⑦2 Erfinder:
Zimmermann, Eberhard, Prof. Dr., 4400 Münster, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 **Knochenersatzmaterial und Verfahren zu dessen Herstellung**

Ein vollständig resorbierbares, die Knochenneubildung förderndes Knochenersatzmaterial besteht aus einer verdichteten Matrix aus vernetztem Plasmaprotein, in der Calciumphosphat-Partikel homogen verteilt sind, und bildet einen festen, mechanisch bearbeitbaren Formkörper mit einer Dichte von wenigstens 0,6 g/cm³. Zur Herstellung werden Plasmaprotein, Calciumphosphat-Partikel und gegebenenfalls wahlweise vorgesehene Zusätze in einem wäßrigen Lösungsmittel homogen verteilt. Die resultierende Suspension wird mit einem Vernetzungsmittel versetzt und daraufhin eine Vernetzungsreaktion durchgeführt. Die nach der Vernetzung erhaltene gallertartige Masse wird verdichtet, nämlich unter mechanischer Druckausübung wird aus der Masse Lösungsmittel herausgepreßt und deren Volumen verkleinert. Das verdichtete Material wird tiefgefroren, gefriergetrocknet, bei Bedarf mechanisch bearbeitet, sterilisiert und alsbald implantiert oder gelagert.

35 17 456 A1

PATENTANWÄLTE

TISCHER, KERN & BREHI
3517456

Albert-Rosshaupter-Strasse 65 · D 8000 München 70 · Telefon (089) 7605520 · Telex 5-212284 patsd · Telegramme Kernpatent Münch

Serapharm GmbH & Co. KG
Kaiser-Wilhelm-Ring 39
D-4400 Münster

14. Mai 1985

SM-29

Knochenersatzmaterial und Verfahren zu dessen Herstellung

Patentansprüche:

1. Knochenersatzmaterial,
im wesentlichen bestehend aus einer Matrix aus vernetztem
Plasmaprotein, in der Calciumphosphat-Partikel homogen ver-
teilt sind,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Material einen festen, mechanisch bearbeitbaren Form-
körper mit einer Dichte von wenigstens $0,6 \text{ g/cm}^3$ bildet.
2. Knochenersatzmaterial nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Material eine Dichte von wenigstens $0,8 \text{ g/cm}^3$ aufweist.

3. Knochenersatzmaterial nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Material eine Shore-D-Härte von wenigstens 40 aufweist.
4. Knochenersatzmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Material eine Biegebruchfestigkeit von wenigstens 20,
vorzugsweise von wenigstens 25 N/mm² aufweist.
5. Knochenersatzmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß
auf ein Gew.-Teil Plasmaprotein 0,2 bis 1,2 Gew.-Teile
Calciumphosphat-Partikel vorhanden sind.
6. Knochenersatzmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Plasmaprotein Fibrinogen, Fibronectin, Albumin und/
oder Globulin dienen.
7. Knochenersatzmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Plasmaprotein Fibrinogen dient.
8. Knochenersatzmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Material zusätzlich einen oder mehrere Fibrinolyse-
Inhibitor(en) enthält.

9. Knochenersatzmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Material zusätzlich einen oder mehrere Wachstumsfaktor(en)
enthält.
10. Knochenersatzmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Material zusätzlich ein oder mehrere Glykosaminglykan(e)
enthält.
11. Verfahren zur Herstellung eines Knochenersatzmaterials,
wobei Plasmaprotein, Calciumphosphat-Partikel und gegebenen-
falls wahlweise vorgesehene Zusätze in einem wässrigen oder
überwiegend wässrigen Lösungsmittel homogen verteilt werden,
die resultierende Suspension mit einem Vernetzungsmittel ver-
setzt, und eine Vernetzungsreaktion durchgeführt wird, und
das schließlich erhaltene Material tiefgefroren, gefrierge-
trocknet, bei Bedarf mechanisch bearbeitet, sterilisiert und
alsbald implantiert oder gelagert wird,
dadurch gekennzeichnet, daß
die nach der Vernetzung erhaltene gallertartige Masse ver-
dichtet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, daß
auf die nach der Vernetzung erhaltene gallertartige Masse
mechanischer Druck ausgeübt wird, um Lösungsmittel heraus-
zupressen und das Volumen der Masse zu verkleinern.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,
dadurch gekennzeichnet, daß

auf die nach der Vernetzung erhaltene gallertartige Masse mechanischer Druck ausgeübt wird, um Lösungsmittel herauszupressen, und das Volumen auf wenigstens die Hälfte des Massenvolumens nach der Vernetzung zu verringern.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei 15 bis 30 Gew.-Teile Plasmaprotein in 100 Gew.-Teilen Lösungsmittel verteilt worden sind, dadurch gekennzeichnet, daß auf die nach der Vernetzung erhaltene gallertartige Masse solange mechanischer Druck ausgeübt wird, bis das Volumen der vernetzten Masse - unter Flüssigkeitsaustritt - auf etwa $1/2$ bis $1/5$ des Ausgangsvolumens verringert worden ist.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß auf die nach der Vernetzung erhaltene, gallertartige Masse solange mechanischer Druck ausgeübt wird, bis aus der vernetzten Masse - unter üblichen Bedingungen - keine weitere Flüssigkeit herausgepreßt werden kann.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß auf die nach der Vernetzung erhaltene gallertartige Masse ein mechanischer Druck von etwa 10 bis 30 bar ausgeübt wird.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die mechanische Druckausübung mittels eines beweglichen Stempels aus feinpörigem Material erfolgt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 17,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Vernetzungsmittel Diazomethan verwendet wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 18,
dadurch gekennzeichnet, daß
die nach der Vernetzungsreaktion erhaltene gallertartige
Masse gegen eine Wachstumsfaktor-Lösung dialysiert und da-
raufhin die Verdichtung vorgenommen wird.

PATENTANWALTE

6 TISCHER, KERN & BREHM
3517456

Albert-Rosshaupter-Strasse 65 · D 8000 München 70 · Telefon (089) 7605520 · Telex 5-212284 patsd · Telegramme Kernpatent München

Serapharm GmbH & Co. KG
Kaiser-Wilhelm-Ring 39
D-4400 Münster

14. Mai 1985

SM-29

Knochenersatzmaterial und Verfahren zu dessen Herstellung

Beschreibung:

Die Erfindung betrifft ein Knochenersatzmaterial. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Knochenersatzmaterials. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Knochenersatzmaterial, das im wesentlichen aus einer Matrix aus vernetztem Plasmaprotein besteht, in welcher Matrix Calciumphosphat-Partikel homogen verteilt sind. Weiterhin kann das Knochenersatzmaterial verschiedene Zusätze, wie etwa Fibrinolyse-Inhibitoren, Wachstumsfaktoren, Antibiotika, homologes Knochenmaterial und dgl. enthalten.

Ein Material dieser Art ist aus der Europäischen Patentpublikation 00 68 149 A 1 bekannt. Das bekannte Material kann als Füllmaterial für pathologische Knochenhöhlräume dienen, bildet ein durch Gefriertrocknung erhaltenes Trockenpräparat mit Schaum- bzw. Vliesstruktur, und besteht neben zumindest

katalytisch wirksamen Mengen Thrombin im wesentlichen aus etwa 30 bis 45 Gew.-% Fibrin, etwa 4 bis 15 Gew.-% Fibrinogen sowie aus natürlichem, feinteiligem Knochenmaterial und/oder synthetischem, knochenbildendem Ersatzstoff und wenigstens einem antibakteriellen Wirkstoff. Als synthetischer, knochenbildender Ersatzstoff kommen anorganische Salze des Kaliums, Magnesiums und Calciums, insbesondere Tricalciumphosphat in Betracht. Zusätzlich kann das Vlies die Kallusbildung anregende Wirkstoffe wie etwa Thrombozyten-Wachstumsfaktoren oder Hormone enthalten.

Das bekannte Trockenpräparat ist durch Gefriertrocknung einer verdünnten, wässrigen Lösung bzw. Suspension erhalten worden, welche typischerweise 1 g Plasmaprotein in etwa 10 ml Wasser enthält. Wie für Lyophilisate typisch, weist es eine außerordentlich leichte, lockere, mit einer Vielzahl von Hohlräumen durchsetzte Schaum- oder Vliesstruktur auf, deren Dichte noch deutlich unter $0,2 \text{ g/cm}^3$ liegt. Im Kontakt mit Körperflüssigkeit kollabiert ein solches Vlies und bildet eine weiche, breiige Masse ohne Eigensteifigkeit.

Das natürliche Knochengewebe stellt ein außerordentlich differenziertes Gewebe dar, bildet die festen, biegungselastischen Teile des Skeletts und dient als Ursprungs- und Ansatzort für die Skelettmuskeln.

In der wissenschaftlichen Literatur werden beispielsweise folgende mechanische Festigkeitswerte angegeben:

Untersuchungen von Dempster und Colemann, 1960

	<u>Biegefestigkeit</u>
Human. Schienbein, trocken, parallel*	$258,3 \pm 28,0 \text{ N/mm}^2$
Human. Schienbein, feucht, parallel*	$191,4 \pm 11,9 \text{ N/mm}^2$

	<u>Biegefestigkeit</u>
Human. Schienbein, trocken, quer*	$43,3 \pm 13,1 \text{ N/mm}^2$
Human. Schienbein, feucht, quer*	$32,6 \pm 6,6 \text{ N/mm}^2$
Human. Unterkieferknochen, trocken, parallel*	$164,8 \pm 47,8 \text{ N/mm}^2$
Human. Unterkieferknochen, trocken, quer*	$70,1 \pm 23,9 \text{ N/mm}^2$

* parallel bzw. quer zur Vorzugsrichtung des Havers-System
Untersuchungen von McElhaney et al, 1970

	<u>Bruch-Druckfestigkeit</u>
Human. Schädelknochen, radial	$75,2 \pm 35,9 \text{ N/mm}^2$
Human. Schädelknochen, tangential	$98,4 \pm 36,6 \text{ N/mm}^2$

	<u>Druck-Elastizitäts-Modul</u>
Human. Schädelknochen, radial	$2461 \pm 1476 \text{ N/mm}^2$
Human. Schädelknochen, tangential	$5694 \pm 3093 \text{ N/mm}^2$

Durch pathologische Prozesse, wie etwa Tumorenfraß, chronische Osteomyelitis, Tuberkulose, Knochennekrose, Zystenbildung und dgl. kann Knochenmaterial zerstört oder durch unfallbedingte Faktoren und dgl. zertrümmert werden. Insbesondere, wenn es sich um einen mechanisch belasteten Knochen handelt, besteht der Wunsch nach Ausfüllung des entstandenen Knochenhohlraumes und/oder Ersatz der zerstörten Knochenpartie durch ein Knochenersatzmaterial, das ausreichende mechanische Eigenschaften aufweisen soll, um die typische Belastbarkeit in Grenzen zu gewährleisten, und die Knochenneubildung zu fördern. Hierbei soll das Knochen-

ersatzmaterial vollständig resorbierbar sein, und im Ausmaß der Knochenneubildung abgebaut und in natürliches Knochengewebe umgewandelt werden. Ferner soll ein solches Knochenersatzmaterial mechanisch bearbeitbar sein, damit es genau an die Kontur eines vorgegebenen pathologischen Knochenhohlraumes oder Defektes angepaßt werden kann. Schließlich soll das Knochenersatzmaterial aufgrund seiner Zusammensetzung die Gefäßneubildung, die Einsprossung von Gewebezellen und die Kallusbildung fördern.

Ausgehend von einem Knochenersatzmaterial der oben bezeichneter Art besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, unter Beibehaltung der vorteilhaften Eigenschaften wie vollständige Resorbierbarkeit, Förderung der Knochenneubildung und angepaßte, allmähliche Umwandlung in natürliches Knochengewebe die mechanischen Eigenschaften, insbesondere Dichte, Härte und Biegebruchfestigkeit ganz wesentlich zu steigern, und eine gute mechanische Bearbeitbarkeit zu gewährleisten.

Insbesondere besteht ein Ziel der vorliegenden Erfindung darin, ein solches Knochenersatzmaterial bereitzustellen, das aufgrund seiner Härte, Steifigkeit und Biegebruchfestigkeit einen mechanisch belasteten Knochen ersetzen kann.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, einen im wesentlichen aus Plasmaprotein und Calciumphosphat-Partikeln bestehenden Formkörper bereitzustellen, der mechanisch bearbeitbar ist, beispielsweise geschnitten, gesägt, gefräst, gebohrt und/oder gefeilt werden kann, um mit dem bearbeiteten Formkörper einen Hohlraum oder Defekt in einem mechanisch belasteten Knochen auszufüllen, der die Knochenneubildung fördert und sich allmählich in natürliches Knochengewebe umwandelt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein im gewerblichen Maßstab durchführbares Verfahren zur Herstellung eines solchen Knochenersatzmaterials anzugeben. Durch einfache Variation der Verfahrensmaßnahmen soll es möglich sein, wesentliche Eigenschaften des Knochenersatzmaterials, wie Größe, Verweilzeit, mechanische Belastbarkeit und dgl. in weitem Umfang an die hauptsächlich vorkommenden Bedarfsprofile anzupassen.

Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Knochenersatzmaterials anzugeben, das durch Variation der Verfahrensmaßnahmen die Herstellung bestimmter, an einen jeweiligen Patienten und dessen Knochendefekt individuell angepaßter Knochenersatzstücke erlaubt, die gezielt im Hinblick auf einen bestimmten Krankheitsfall herstellbar und kurz nach der Herstellung implantierbar sind.

Weitere Aufgaben, Ziele, Vorteile und Besonderheiten der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung.

Ausgehend von einem Knochenersatzmaterial der oben bezeichneten Art besteht die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe und Ziele darin, die im wesentlichen aus vernetztem Plasmaprotein und Calciumphosphat-Partikeln bestehende Matrix ganz erheblich zu verdichten, um einen festen, mechanisch bearbeitbaren Formkörper bereitzustellen. Nach der Verdichtung und abschließenden Gefriertrocknung soll die Dichte des fertigen Knochenersatzmaterials wenigstens $0,6 \text{ g/cm}^3$ betragen. Vorzugsweise soll die Dichte des fertigen Knochenersatzmaterials wenigstens $0,8 \text{ g/cm}^3$ und besonders bevorzugt wenigstens $1,0 \text{ g/cm}^3$ betragen.

Zur Herstellung dieses Knochenersatzmaterials werden die Ausgangskomponenten, nämlich Plasmaprotein und Calciumphosphat-

Partikel sowie wahlweise Zusätze wie Fibrinolyse-Inhibitor(en), Wirkstoff(e), Wachstumsfaktor(en), natürliches, homogenes Knochenmaterial und dgl. in einem überwiegend wässrigen Lösungsmittel gelöst bzw. suspendiert. Nach Zusatz eines Vernetzungsmittels wird eine Vernetzungsreaktion durchgeführt. Die nach der Vernetzung erhaltene gallertartige Masse wird verdichtet, d.h., unter Volumenverkleinerung wird aus dieser gallertartigen Masse Lösungsmittel entfernt; insbesondere wird durch Anwendung mechanischen Druckes aus dieser Masse Wasser herausgepreßt. Nachdem ausreichend verdichtet worden ist, beispielsweise das Volumen der aus einem konzentrierten Ansatz (ca. 5 g Plasmaprotein innerhalb ca. 20 ml Wasser) nach Vernetzung erhaltenen gallertartigen Masse auf wenigstens die Hälfte verringert oder noch besser auf wenigstens $1/3$ verkleinert worden ist, wird das schließlich erhaltene Material tiefgefroren, gefriergetrocknet, bei Bedarf mechanisch bearbeitet, sterilisiert und alsbald implantiert oder gelagert.

Aufgrund der erfindungsgemäß vorgesehenen Verdichtung weist das fertige Knochenersatzmaterial überraschende Eigenschaften auf. Das Knochenersatzmaterial bildet einen festen, mechanisch bearbeitbaren Formkörper mit homogener Struktur und isotropen Eigenschaften. Die Abmessungen sind nicht beschränkt; vielmehr lassen sich ohne weiteres Formkörperstücke mit einer Länge von 5 bis 10 cm und mehr, sowie mit einem Volumen von 100 cm^3 und mehr herstellen. Seine Shore-D-Härte beträgt wenigstens 40. Die Biegebruchfestigkeit dieses Knochenersatzmaterials beträgt vorzugsweise wenigstens 20 N/mm^2 und besonders bevorzugt wenigstens 25 N/mm^2 . Damit liegt die Biegebruchfestigkeit des erfindungsgemäßen Knochenersatzmaterials größenordnungsmäßig in einer Bereich wie er von Dempster und Colemann für Unterkieferknochen quer zur Vorzugsrichtung des Havers-Systems angegeben ist. Die Druckfestigkeit des erfindungsgemäßen Knochenersatzmaterials beträgt vorzugsweise wenigstens 10 N/mm^2 .

Trotz dieser hervorragenden mechanischen Eigenschaften stellt

dar, welches das Einsprossen von natürlichen Gewebezellen, Gefäßen und dgl. unterstützt, die Kallusbildung fördert und sich allmählich und vollständig in natürliches Knochengewebe umwandelt. Hierin besteht ein ganz wesentlicher Unterschied zu anderen bekannten, praktisch "biologisch toten" Knochenersatz- und Prothesematerialien, die beispielsweise aus unter Wärme- und/oder Druck-Einwirkung miteinander verarbeiteten Massen aus Kollagen und Bindemittel, etwa einem Copolymeren aus Laktit und/oder Glykolit-Einheiten bestehen können (vgl. DE-OS 28 43 963) oder aus unter un-physiologischen Bedingungen gefällt und mittels Formaldehyd vernetztem Fibrin bestehen können (vgl. US-PS 3 523 807).

Nach den bisher bekanntgewordenen Vorschlägen war es nicht möglich gewesen, aus Plasmaproteinen einen homogenen, festen, mechanisch belastbaren Formkörper praktisch beliebiger Abmessungen im Sinne einer Eiweißplastik herzustellen, ohne die biologische Aktivität des Plasmaproteins weitgehend oder völlig zu zerstören. Hier schafft die vorliegende Erfindung neuartige Prothese- und Knochenersatzmaterialien, die einerseits fest, hart, mechanisch bearbeitbar und belastbar sind, und andererseits trotzdem biologisch aktiv sind, nämlich sich angepaßt an die Knochenneubildung allmählich in natürliches Knochengewebe umwandeln und schließlich völlig resorbiert werden. Die erfindungsgemäß vorgesehene Vernetzung und Verdichtung wird in wässrigem Milieu unter schonenden Bedingungen vorgenommen, so daß die Struktur und biologische Aktivität des Proteins weitgehend erhalten bleibt. Erstmals lassen sich auf diesem Weg aus Eiweiß feste, mechanisch bearbeitbare Formkörper herstellen.

Nachstehend wird die Erfindung mehr im einzelnen erläutert.

Wie dargelegt, besteht das erfindungsgemäße Knochenersatzmaterial hauptsächlich aus einer Matrix aus vernetztem Plasmaprotein, in der Calciumphosphat-Partikel homogen verteilt sind. Als Plasmaproteine kommen vorzugsweise Fibrinogen, Fibronectin, Albumin und/oder Globulin in Betracht. Besonders bevorzugt wird als Plasmaprotein Fibrinogen eingesetzt. Auch Gemische aus mehreren Plasmaproteinen sind möglich, beispielsweise Gemische aus Fibrinogen und Albumin. Vorzugsweise werden Plasmaproteine humanen Ursprungs eingesetzt, um Antigen-Reaktionen und dgl. auszuschließen.

Ein gut geeignetes Fibrinogen-Präparat kann beispielsweise nach folgender Vorschrift erhalten werden.

100 Vol.-Teile Humanplasma werden mit 10 Vol.-Teilen konz. Calciumphosphat-Lösung ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) versetzt. Das Gemisch wird abzentrifugiert, und das dabei erhaltene Sediment verworfen. Der Überstand wird auf 15°C abgekühlt und in einem Anteil von $1/6$ seines Volumens mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (Na_2SO_4) versetzt. Der resultierende Überstand wird verworfen, und das gebildete Sediment in 0,15 M NaCl-Lösung gelöst. Die erhaltene Lösung wird nochmals mit Ammoniumsulfat gefällt. Das daraufhin erhaltene Sediment wird in Wasser gelöst und lyophilisiert.

Darüberhinaus stellen die erfindungsgemäß vorgesehenen Plasmaproteine humanen Ursprungs handelsübliche Präparate dar, die im Feinchemikalienhandel beziehbar sind, beispielsweise von der Firma Behring-Werke, Marburg.

Weiterhin enthält das erfindungsgemäße Knochenersatzmaterial Calciumphosphat-Partikel. Diese tragen zur Festigkeit des Knochenersatzmaterials bei und fördern das Knochenwachstum. Die Calciumphosphat-Partikel können aus beliebigem, im physiologischen Milieu unlöslichem Calciumphosphat bestehen, welches das natürliche Knochenwachstum unterstützt. Beispielsweise kann

das zu diesem Zweck bekannte Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) eingesetzt werden. Besonders bevorzugt wird Hydroxyapatit ($3\text{Ca}(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$) eingesetzt, weil dessen Umstrukturierung in natürliches Knochengewebe besonders rasch verläuft. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung hat sich ein Hydroxyapatit, das von der Firma Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, unter der Handelsbezeichnung "Hydroxyapatite" (Calciumphosphathydroxid) vertrieben wird, besonders bewährt und wird vorzugsweise eingesetzt. Die Calciumphosphat-Partikel sollen feinteilig sein und vorzugsweise eine mittlere Teilchengröße kleiner $200 \mu\text{m}$, besonders bevorzugt kleiner $100 \mu\text{m}$ aufweisen. Die Calciumphosphat-Partikel sind in der Plasmaprotein-Matrix homogen verteilt.

Die jeweiligen Anteile an Plasmaprotein und Calciumphosphat-Partikel beeinflussen die mechanischen Eigenschaften des Fertigproduktes. Vorzugsweise sind auf 1 Gew.-Teil Plasmaprotein 0,2 bis 1,2 Gew.-Teile Calciumphosphat-Partikel vorgesehen. Bei weniger als 0,2 Gew.-Teilen Calciumphosphat-Partikel ist die erzielbare Festigkeit des Fertigproduktes ungenügend. Auch bei mehr als 1,2 Gew.-Teilen Calciumphosphat-Partikeln nimmt die Festigkeit des Formkörpers rasch ab. Man erhält ein bröckeliges, brüchiges Material, das in manchen Fällen als Füllmaterial für pathologische Knochenhölräume brauchbar sein kann, jedoch ist die Biegebruchfestigkeit eines solchen Materials für den Ersatz eines mechanisch belasteten Knochens zu gering. Vorzugsweise wird ein Anteil von etwa 0,4 bis 0,8 Gew.-Teilen Calciumphosphat-Partikel auf 1 Gew.-Teil Plasmaprotein vorgesehen. Besonders gute Ergebnisse werden mit einem Anteil von etwa 0,5 Gew.-Teilen Calciumphosphat-Partikel auf 1 Gew.-Teil Plasmaprotein erhalten. Ein solches Material zeigt nach Verdichtung und ausreichender Verdichtung besonders gute mechanische Eigenschaften, wie etwa eine Biegebruchfestigkeit von 30 N/mm^2 und mehr, sowie eine Druckfestigkeit von ca. 12 N/mm^2 , und wird derzeit besonders bevorzugt eingesetzt.

Um eine homogene Verteilung zu erreichen, werden Plasmaprotein und Calciumphosphat-Partikel in einem Lösungsmittel miteinander vermischt. Vorzugsweise wird in einem wässrigen oder überwiegend wässrigen Lösungsmittel gearbeitet. Bei diesem Lösungsmittel kann es sich um Wasser, Human-Serum oder um eine wässrige Salzlösung handeln. Der pH-Wert und der Salzgehalt der Salzlösung sollen weitgehend an die physiologischen Bedingungen angepaßt sein; beispielsweise kann physiologische Kochsalzlösung oder Ringer-Lösung eingesetzt werden. In manchen Fällen kann es zweckmäßig sein, eine überwiegend wässrige Lösung zu verwenden, die neben Wasser auch wasserlösliche, organische Lösungsmittel enthält, beispielsweise, um die Löslichkeit für bestimmte Arzneimittel-Wirkstoffe zu erhöhen. Zu geeigneten organischen Lösungsmitteln gehören einwertige Alkohole wie etwa Äthanol oder Isopropanol, mehrwertige Alkohole wie Glyzerin oder Polyglykole, cyclische Äther wie Dioxan und dgl.. Der maximale Anteil an organischem Lösungsmittel darf die später vorgesehene Lyophilisierung nicht beeinträchtigen; zumeist soll der Anteil an organischem Lösungsmittel 10 Vol.-% der gesamten Lösungsmittelmenge nicht übersteigen.

Vorzugsweise wird bei Zimmertemperatur oder lediglich mäßig erhöhten Temperaturen bis zu etwa 35°C gearbeitet, um jegliche Denaturierung des Plasmaproteins zu vermeiden. In einigen Fällen kann jedoch auch eine gezielte Denaturierung des Plasmaproteins zweckmäßig sein, beispielsweise, wenn eine besonders hohe Verweilzeit des Knochenersatzmaterials im Organismus angestrebt wird; dies kann beispielsweise bei einem Implantat für einen älteren Patienten mit verlangsamtem Knochenwachstum zweckmäßig sein. In einem solchen Falle kann beispielsweise Fibrinogen oder eines der anderen Plasmaproteine in wässriger Lösung auf Temperaturen von 70 bis 80°C erhitzt werden. Nach einer solchen Wärmebehandlung fällt das teilweise denaturierte Protein als Feststoff an, der nach Trocknung pulverisiert und in dieser Form eingesetzt werden kann.

Die Lösungsmittelmenge bzw. die Proteinkonzentration innerhalb des flüssigen Ansatzes hängen von verschiedenen Faktoren ab. In erster Linie muß nach der Vernetzungsreaktion eine gallertartige Masse mit ausreichender Eigensteifigkeit und Zusammenhalt erhalten werden, damit man aus dieser Masse das Lösungsmittel mechanisch herauspressen kann, ohne gleichzeitig übermäßig viel Protein zu verlieren. Der flüssige Ansatz soll deswegen wenigstens 2 g Protein in 100 ml Lösungsmittel enthalten. Eine höhere Proteinkonzentration wird bevorzugt, weil das Lösungsmittel im nachfolgenden Verdichtungsschritt weitestgehend aus der vernetzten Plasmaprotein-Matrix herausgepreßt werden muß. Andererseits kann eine zu hohe Proteinkonzentration das Ergebnis der Vernetzungsreaktion beeinträchtigen. Angestrebt wird ein homogenes, möglichst vollständig vernetztes Produkt mit drei-dimensional vernetzten Polymersträngen. Bei zu hoher Proteinkonzentration kann ein weniger erwünschtes teilchenförmiges Material anfallen. Jedoch sind noch sehr gute Ergebnisse mit einer Konzentration von 30 g Plasmaprotein in 100 ml Wasser erhalten worden.

Da vorzugsweise Plasmaproteine aus Humanserum eingesetzt werden, kann es im Einzelfall zweckmäßig sein, die wässrige Plasmaproteinlösung vor der Weiterverarbeitung zu sterilisieren, beispielsweise um gezielt Viren, wie etwa Hepatitis-Viren, zu inaktivieren. Hierzu kann eine Behandlung mit β -Propiolacton, gefolgt von einer UV-Bestrahlung, vorgesehen werden. Alternativ kann mit energiereicher γ - oder Röntgenstrahlung sterilisiert werden.

Die Vernetzung des Plasmaproteins kann mit üblichen Vernetzungsmitteln erfolgen. Zu geeigneten Vernetzungsmitteln gehören zweiwertige, mit den vorhandenen Aminogruppen Peptid-Bindungen ergebende Substanzen wie etwa Glutaraldehyd, Phenol-2,4-disulfonylchlorid, Adipinsäure und deren Derivate wie etwa Dimethyladipinnidat und dgl.. Wichtig bei der Auswahl des

14.05.66

- 17 -

3517456

Vernetzungsmittels ist, daß eine vollständige Vernetzung erzielt und ein unlösliches Produkt erzeugt wird. Vorzugsweisen dienen als Vernetzungsmittel Diazomethan (CH_2N_2) oder Thionylchlorid (SOCl_2), wobei Diazomethan besonders bevorzugt wird. Diazomethan ist unter den gewählten Bedingungen (wässriges System, Raumtemperatur) recht aktiv, erzeugt ausschließlich physiologisch unbedenkliche Methylenbrücken, ohne das Protein zu denaturieren, und der bei der Reaktion anfallende Stickstoff kann leicht aus dem System entfernt werden. Thionylchlorid erweist sich ebenfalls als mildes, aber wirkungsvolles Vernetzungsmittel, das physiologisch unbedenkliche Brücken erzeugt. Vorzugsweise wird mit einem Überschuß an Vernetzungsmittel gearbeitet, um eine vollständige dreidimensionale Vernetzung des Plasmaproteins zu erreichen. Ein nach Abschluß der Reaktion verbleibender Anteil an Vernetzungsmittel kann durch Dialyse entfernt werden.

Vorzugsweise wird die Vernetzungsreaktion in einem quaderförmigen oder würfelförmigen Behälter durchgeführt, um die spätere Verdichtung des Vernetzungsproduktes zu erleichtern. Nachdem das Vernetzungsmittel zugesetzt und gleichmäßig im Ansatz verteilt worden ist, läßt man einige Stunden lang unbewegt stehen, um eine drei-dimensionale Vernetzung des gesamten Ansatzes zu erreichen. Man erhält eine weißliche, gallertartige Masse, die in feuchtem Zustand noch verformbar ist. Die gesamte, im ursprünglichen Ansatz enthaltene Menge Wasser ist gebunden bzw. in das Netzwerk eingebaut; weder läßt sich aus einem geeignet vernetzten Produkt freies Wasser abgießen, noch kann durch bloße Anwendung von Unterdruck eine nennenswerte, auf Abdampfung von Wasser hindeutende Gewichtsverminderung erzielt werden.

Nach einem wesentlichen Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung ist es erforderlich, diese gallertartige Masse zu verdichten. Die Verdichtung bewirkt eine Volumenverkleinerung durch wenigstens teilweise, vorzugsweise weitgehende Entfernung des Lösungsmittels. Dabei werden die Polymerisatstränge einander

Im Labormaßstab hat sich eine zweistufige Verdichtung als zweckmäßig erwiesen. In der ersten Stufe wurde der gesamte, vorzugsweise würfelförmige Ansatz in eine angepaßte Form mit würfelförmigem Formhohlraum gegeben, und mit einem saugfähigen Stempel auf eine Würfel­fläche mechanischer Druck ausgeübt, um Wasser herauszupressen. Daraufhin wurde der Ansatz gewendet und nacheinander auf jede Würfel­fläche mechanischer Druck ausgeübt. Als saugfähiger Stempel kann beispielsweise eine frische Platte aus gebranntem Ton dienen. Auf diese Weise wird eine isostatische Verdichtung bewirkt. Auch andere Verdichtungsmaßnahmen und -vorrichtungen sind möglich. Beispielsweise kann mit einer isostatischen Presse gearbeitet werden, die den Austritt von Lösungsmittel zuläßt, jedoch das vernetzte Protein im wesentlichen zurückhält.

Der teilverdichtete Ansatz wurde daraufhin in Stücke passender Größe unterteilt, die nach der vollständigen Verdichtung die Abmessungen des gewünschten Implantates hatten. Diese Stücke werden einzeln in eine geeignete Form eingelegt. Die Form wurde in ein Preßwerkzeug eingesetzt. Unter Zwischenlage eines Kunststoffsiebes, um den Austritt von Flüssigkeit zu gewährleisten, wurde mittels eines hebelbetätigten Stempels einachsiger weiterverdichtet. Der mittels Körperkraft aufgebrachte Preßdruck betrug etwa 10 bis 30 bar. Alternativ könnte auch diese zweite Verdichtungsstufe mittels einer isostatisch arbeitenden Presse oder dgl. durchgeführt werden.

Sämtliche Verdichtungsmaßnahmen werden bei Raumtemperatur unter Normalbedingungen durchgeführt. Vorzugsweise wird die Verdichtung bei Raumtemperatur, jedenfalls bei Temperaturen unter 35°C durchgeführt, um Schädigungen des Plasmaproteins zu vermeiden. Auch wird die Verdichtung vorzugsweise nicht plötzlich durchgeführt, sondern allmählich entsprechend dem Flüssigkeitsanfall, um die Netzstruktur der Proteinmatrix nicht zu zerstören.

Zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verdichtung wird auf die gallertartige Masse mechanischer Druck ausgeübt, um deren Volumen zu verringern und um Lösungsmittel herauszupressen. Die Druckausübung kann in verschiedenen Vorrichtungen erfolgen, beispielsweise mit einem scheibenförmigen Stempel in einer zylindrischen Form oder in einer isostatischen Presse. Das Stempel- und/oder das Wandmaterial ist vorzugsweise ein Mikro-poröses Material mit so geringer Porenweite, daß lediglich die kleinen Lösungsmittel-Moleküle hindurchdringen können. Im Labormaßstab ist beispielsweise ein Stempel aus einer porösen Tonplatte verwendet worden.

Die Verdichtung wird solange fortgesetzt, bis eine ganz wesentliche Volumenverkleinerung erreicht ist. Ziel der Verdichtung ist, unter entsprechender Volumenverringering das Wasser weitgehend vollständig aus der vernetzten Proteinmatrix herauszupressen. Selbst bei Ansätzen mit hoher Proteinkonzentration soll das Volumen der nach der Vernetzung erhaltenen, gallertartigen Masse auf wenigstens die Hälfte verringert werden, um ein Knochenersatzmaterial mit ausreichender mechanischer Bearbeitbarkeit und Festigkeit zu erhalten. Vorzugsweise wird die vernetzte Masse bis auf wenigstens $1/3$ ihres Ausgangsvolumens verdichtet. Bei Proteinkonzentrationen von etwa 15 bis 30 g Plasma-protein im flüssigen Ansatz hat sich eine Verdichtung gut bewährt, die das Volumen der vernetzten gallertartigen Masse auf etwa $1/2$ bis $1/5$ des Ausgangsvolumens verringert. Ein solches Ausmaß an Verdichtung wird vorzugsweise angewandt. Bei stärker verdünnten Ausgangslösungen wird die Verdichtung solange fortgesetzt, bis eine noch weitgehendere Volumenverkleinerung erreicht ist; beispielsweise kann hier das Volumen der vernetzten Masse bis auf $1/10$ und weniger des Ausgangsvolumens verringert werden. Eine solche Verdichtung kann unter üblichen Laborbedingungen im Verlauf von etwa 3 bis 4 h unter einem Druck von etwa 10 bis 30 bar erreicht werden.

Eine besonders hohe Verdichtung wird dann vorgesehen, wenn besonders harte Knochenersatzstücke mit langer Verweilzeit im lebenden Organismus gewünscht werden.

Der nach der Verdichtung erhaltene Formkörper ist in physiologischem Milieu unlöslich. Beim erneuten Einbringen in Wasser quillt er nur geringfügig; die Volumenzunahme beträgt weniger als 3 %.

Nachdem die vernetzte, gallertartige Masse im gewünschten Ausmaß verdichtet worden ist, wird das verdichtete Produkt gefriergetrocknet, um auch Restanteile an Lösungsmittel zu entfernen. Die Gefriertrocknung kann unter üblichen Bedingungen erfolgen.

Nachdem der Formkörper im Anschluß an die Gefriertrocknung wieder auf Raumtemperatur gebracht worden ist, kann er mechanisch bearbeitet werden, beispielsweise gesägt, geschnitten, gefräst, gefeilt und/oder gebohrt werden, um eine Feinanpassung an einen bestimmten Knochendefekt durchzuführen, oder um ein bestimmtes Knochenstück nachzubilden. Beispielsweise ist eine Millimeter-genaue Nachbildung eines Teilstückes einer Kieferkrone erzeugt worden.

Anschließend kann der Formkörper sterilisiert werden; beispielsweise kann über Nacht eine Gassterilisierung erfolgen. Daraufhin kann der Formkörper am folgenden Tag dem Patienten implantiert werden. Alternativ kann der Formkörper bereits in einer geschlossenen Verpackung sterilisiert und daraufhin gelagert werden. Bei 4°C ist der steril verpackte Formkörper praktisch beliebig lange lagerbar.

Vorzugsweise wird der erhaltene, feste, mechanisch bearbeitbare, im wesentlichen aus Eiweiß bestehende Formkörper noch

material angepaßt. So ist es zweckmäßig, die Proteinmatrix vor einem proteolytischen Abbau zu schützen. Hierzu ist die Anwesenheit von einem oder mehreren Fibrinolyse-Inhibitor(en) zweckmäßig. Als beispielhafte Fibrinolyse-Inhibitoren kommen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, ein oder mehrere Antiplasmin, wie etwa α_1 -Antiplasmin, α_2 -Makroglobulin oder Aprotinin, sowie ϵ -Aminocaprinsäure und/oder Trypsin-Inhibitor in Betracht. Vorzugsweise wird sowohl Aprotinin wie Antiplasmin eingesetzt, weil diese Kombination physiologischer Inhibitoren eine universelle Wirksamkeit gegenüber allen körpereigenen Proteasen ausübt. Auf 1 g Plasmaprotein können beispielsweise 20 000 bis 1 000 000 Einheiten (sog. KIE, nämlich Kalikrein-Inaktivator-Einheiten) Aprotinin und/oder 500 bis 2000 Einheiten Antiplasmin vorgesehen werden. Gut bewährt hat sich beispielsweise der von der Bayer AG, Leverkusen, unter der Handelsbezeichnung "Trasylol" vertriebene, natürliche Fibrinolyse-Inhibitor. Der oder die Fibrinolyse-Inhibitor(en) werden vorzugsweise bereits dem Ansatz aus Plasmaprotein, Calciumphosphat-Partikeln und Lösungsmittel zugesetzt, um eine einheitliche Verteilung innerhalb des fertigen Formkörpers zu gewährleisten. Bei der Vernetzungsreaktion wird der Fibrinolyse-Inhibitor zusätzlich am Matrix-Material verankert.

Trotz seiner vergleichsweise hohen Dichte von wenigstens 0,6 g/c vorzugsweise von wenigstens 0,8 g/cm³ soll das erfindungsgemäße Knochenersatzmaterial die Gefäßneubildung unterstützen und die Gewebezelleneinsprossung fördern. Zu diesem Zweck ist die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wünschenswert, die wenigstens in der Randzone des Knochenersatzmaterials verteilt sind. Als solche Wachstumsfaktoren kommen beispielsweise Thrombin, Thrombozytenextrakt, Angionese-Faktor, Endothelzellen-Wachstumsf oder Thrombozyten-Wachstumsfaktor und dgl. in Betracht.

Geeignetes Thrombin soll unter bekannten, standardisierten Bedingungen wenigstens eine biologische Aktivität von 10 000 Ei:

heiten (sog. NIH-Einheiten gemäß dem Standard des National Institute of Health der USA) pro 1 mg Thrombin aufweisen. Geeignete Präparate sind handelsüblich zugänglich, beispielsweise kann geeignetes Thrombin in mikrokristalliner Form mit einer biologischen Aktivität von wenigstens 3 000 NIH-Einheiten/mg Präparat (das neben Thrombin bekannte Stabilisierungsmittel und Trägermaterialien enthält) unter der Handelsbezeichnung "Topostasin" von Hoffmann La Roche, Grenzach, Baden, bezogen werden.

Angionese-Faktor ist ein Protein, das beispielsweise von Tumorzellen gebildet wird und den Anschluß des Gewebes an die Kapillaren der Blutversorgung gewährleistet. Zur Herstellung kann beispielsweise tierisches Gewebe, vorzugsweise aus der Lunge oder Milz homogenisiert, und eine mechanische Zell-Lyse (beispielsweise durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen) durchgeführt werden. Der unlösliche Anteil wird hochtourig abzentrifugiert, und daraufhin der flüssige Überstand abgetrennt und über eine Sepharose 4 B-Säule fraktioniert. Die mittlere Fraktion enthält den gewünschten Angionese-Faktor. Die Wirksamkeit kann im Tierversuch geprüft werden, beispielsweise an Kaninchen durch Implantieren von Gewebestückchen in die Augenhöhle.

Zur Gewinnung von Endothelzellen-Wachstumsfaktor werden Endothelzellen aus Nabelschnur isoliert, gezüchtet, vermehrt und isoliert. Das Zellmaterial wird homogenisiert, und der flüssige Überstand säulenchromatisch aufgearbeitet. Die Wirksamkeit einzelner Fraktionen wird anhand der Beeinflussung des zellulären Wachstums von Fibroblasten getestet.

Der oder die Wachstumsfaktor(en) sollen vorzugsweise in der Randzone des Knochenersatzmaterials vorhanden sein, um die Einsprossung von Gewebezellen und Gefäßen zu fördern. Eine solche Verteilung läßt sich durch Dialyse des vernetzten Materials gegen eine Lösung des Wachstumsfaktors erreichen. Beispielsweise kann die nach der Vernetzung erhaltene gallertartige Masse über Nacht bei 4°C in einer wässrigen Thrombin-Lösung gehalten werden. Anschließend wird die vernetzte, mit Wachstumsfaktor angereicherte Masse verdichtet.

Weiterhin ist es möglich, in das Knochenersatzmaterial einen oder mehrere antibakterielle Wirkstoffe einzuarbeiten. In dieser Hinsicht haben sich Gentamycinsulfat, Penicillin, Tetracyclin und/oder Streptomycin gut bewährt. Zu weiteren, wahlweise vorgesehenen Zusätzen gehören Neomycin und Kanamycin. Diese Wirkstoffe werden vorzugsweise bereits dem anfänglichen Ansatz zugesetzt, um eine homogene Verteilung zu erreichen.

Weiterhin kann das Knochenersatzmaterial Glykosaminglykane enthalten. Die Glykosaminglykane bilden bekanntlich den Hauptbestandteil der Stütz- und Bindegewebe und stellen hochmolekulare, in Lösung viskose Verbindungen dar, die hauptsächlich aus Glukuronsäure und Acetylgalactosamin oder Acetylglykosamin bestehen. Beispielhafte Vertreter sind Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat A, B, C. Zur Isolierung der Chondroitinsulfatproteine kann man Knorpel mit CaCl_2 - oder NaOH-Lösung extrahieren, und aus dem Extrakt die eiweißartigen Begleitstoffe mit Chloroform/Amylalkohol ausfällen. Hyaluronsäure kann beispielsweise aus menschlicher Nabelschnur gewonnen werden. Geeignete Präparate sind im Feinchemikalien-Handel zugänglich, beispielsweise über die Firma FLUKA Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm. Die Anwesenheit solcher Glykosaminglykane erhöht die Elastizität, die Zähigkeit und die Bruchfestigkeit des fertigen Knochenersatzmaterials noch weiter. Beispielsweise kann in den Ansatz aus Plasmaprotein, Calciumphosphat-Partikel und Wasser ein oder mehrere Glykosaminglykanen eingerührt werden. Der Anteil an Glykosaminglykanen kann bis zu etwa 10 Gew.-% des Plasmaproteingehaltes ausmachen.

Schließlich kann es im Einzelfall zweckmäßig sein, in das Knochenersatzmaterial homologes Knochenmaterial, beispielsweise autologe Spongiosa oder lyophilisierte und pulverisierte Knochenstückchen einzuarbeiten.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur weiteren Erläuterung der Erfindung, ohne diese einzuschränken.

Beispiel 1:

Die Ausgangsmaterialien, nämlich

5 g	mikrokristallines Fibrinogen,
2,5 g	Hydroxyapatit mit einer mittleren Teilchengröße von 5 μ m,
100 000 KI-Einh.	Aprotenin,
2 000 KI-Einh.	Antiplasmin, und
200 000 Einheiten	Gentamycin

wurden trocken miteinander vermischt. Das erhaltene Pulvergemisch wurde mit entsalztem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 ml gebracht und der Ansatz gerührt. Nach einer Rührdauer von ca. 1 h bei Zimmertemperatur erhält man eine trübe Suspension.

Diese Suspension wird in eine stabile Kunststoffwanne mit quadratischer Grundfläche geschüttet und mit 2 ml einer 1-%igen Diazomethan-Lösung versetzt. Man rührt weitere 10 min bei Zimmertemperatur und hält den Ansatz daraufhin unbewegt. Hierbei wird die Suspension allmählich fest. Nach ca. 3 bis 4 h ist die Vernetzungsreaktion abgeschlossen und man erhält eine weißliche, gallertartige Masse. Die gesamte, ursprünglich vorhandene Wassermenge ist innerhalb des Netzwerks gebunden. Diese gallertartige, bereits weitgehend formbeständige Masse wird über Nacht gegen eine wässrige Thrombin-Lösung dialysiert, um Wachstumsfaktor in den Randbereich einzubringen. Hierzu löst man ca. 9 000 NIH-Einheiten "Topostasin" in 20 ml Wasser, füllt in ein geeignetes Gefäß, und hängt die würfelförmige, vernetzte Masse so in dieses Gefäß, daß sämtliche Flächen mit Lösung bedeckt sind. Aus einer Rückrechnung des nach der Dialysebehandlung noch in der Lösung vorhandenen Thrombins wurde ermittelt, daß ca. 20 bis 30 % des Thrombins in dem Randbereich der vernetzten Masse verankert worden sind.

Nach der Anreicherung mit Wachstumsfaktor wurde die vernetzte, gallertartige Masse verdichtet. Hierzu wurde die Masse erneut in die Kunststoffwanne eingelegt, und mit einem frischen Tontäfelchen auf die freiliegende Oberfläche mechanischer Druck ausgeübt und die Masse unter Wasseraustritt komprimiert. Die Masse wurde gewendet, und nacheinander Druck auf jede Würfel- fläche ausgeübt. Die Tontäfelchen wurden gegen frische Täfel- chen ausgetauscht, nachdem sie sich voll Wasser gesogen hatten.

Nach ca. 3 h war diese erste Stufe der Verdichtung beendet. Der an sich nun schon weitgehend trockene, teilverdichtete Würfel wurde in 6, annähernd gleich große Quader zerschnitten. Jeder Quader wurde einzeln in eine Form mit angepaßtem Form- hohlraum gelegt, die eine freie Hauptfläche mit einem Kunst- stoffsieb bedeckt, und ein angepaßter Stempel aufgelegt. Diese Einheit wurde daraufhin in eine hebelbetätigte Presse einge- legt und unter manueller Krafteinwirkung weiter verdichtet, bis praktisch keine weitere Hebelbewegung mehr möglich war.

Die fertig verdichteten Formkörper wurden aus der Form heraus- genommen und unter üblichen Bedingungen gefriergetrocknet. Die danach erhaltenen Formkörper waren fest und hatten ein leicht gelbliches knochenähnliches Aussehen. An diesen Proben wurden die nachstehenden Eigenschaften bestimmt.

Dichte:

Die Bestimmung der Dichte entsprechend Verfahren A nach DIN 53 479 ergab einen Wert von ca. $1,1 \text{ g/cm}^3$.

Härte:

Die Bestimmung der Shore-D-Härte nach DIN 53 505 ergab einen Wert von ca. 80.

Biegeversuch:

Der Biegeversuch wurde in Anlehnung an DIN 53 452 unter 3-Punkt-Belastung durchgeführt.

Probenabmessungen:	Länge 38,2 mm, Breite 7,55 mm, Dicke 4,0 mm
Auflagerabstand:	30 mm
Belastungsgeschwindigkeit:	3 mm/min

Hierbei wurde eine Biegebruchfestigkeit von ca. 34 N/mm^2 , eine Biegebruchdehnung von ca. 1,6 % und ein Biege-E-Modul von ca. $2\,000 \text{ N/mm}^2$ ermittelt.

Druckversuch:

Der Druckversuch wurde in Anlehnung an DIN 53 454 an zwei kleineren Abschnitten mit ca. 7 mm Länge durchgeführt. Die Belastungsgeschwindigkeit betrug 0,1 mm/min. Die ermittelten Meßergebnisse lassen auf eine Druckfestigkeit von ca. 10 bis 15 N/mm^2 , auf eine Stauchung bei Bruch von ca. 3 % und auf einen Druck-E-Modul von ca. 320 bis 460 N/mm^2 schließen.

Beispiel 2:

Im wesentlichen wurde das Verfahren nach Beispiel 1 wiederholt. Abweichend wurde aus der nach der ersten Verdichtungsstufe erhaltenen teilverdichteten Masse ein Stück herausgeschnitten, das nach der abschließenden Verdichtung in einer angepaßten Form angenähert die Abmessungen eines Kieferkronen-Teilstückes hatte. Nach der Gefriertrocknung wurde dieses Teilstück mechanisch nachgearbeitet (geschnitzt und gefeilt) und möglichst genau an den Kiefer-Kronendefekt des Patienten

angepaßt. Das feinbearbeitete Kieferkronen-Teilstück wurde sterilisiert und daraufhin dem Patienten implantiert. Das Knochenersatzmaterial wurde ohne Abstoßungs- oder Entzündungsreaktionen vom Organismus aufgenommen. Die Resorptionsrate ist nach diesen Erfahrungen allein vom Ausmaß der Verdichtung abhängig.

Beispiel 3:

Im wesentlichen wurde das Verfahren nach Beispiel 1 wiederholt. Abweichend wurde Fibrinogen durch die gleiche Menge Albumin ersetzt. Die Vernetzungsreaktion verläuft genauso glatt, wie die Vernetzung von Fibrinogen. Die Farbe des Fertigproduktes ist etwas gelblicher. Das fertige Knochenersatzmaterial ist etwas bröckeliger und kann beispielsweise für Kieferhöhlen-Plastiken verwendet werden, weil die Paßform leichter durch einfaches Abbrechen erreicht werden kann.

Beispiel 4:

Im wesentlichen wurde das Verfahren nach Beispiel 1 wiederholt. Abweichend wurde ein Gemisch von Plasmaproteinen verwendet, nämlich Trockenplasma mit vorwiegend Albumin, Globulin und Fibrinogen. Das fertige Knochenersatzmaterial ist nicht so mechanisch stabil, wie das nach Beispiel 1 erhaltene Material.

Beispiel 5:

Im wesentlichen wurde das Verfahren nach Beispiel 1 wiederholt. Abweichend wurde dem Absatz zusätzlich 300 mg Chondroitinsulfat (Na-Salz), bezogen von FLUKA Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm, zugesetzt. Die Ergebnisse des Biegeversuches lassen auf etwas höhere Werte schließen.

TRANSLATION
OF THE RELEVANT TEXT PASSAGES
FROM CITATION D10
(GERMAN LAYING-OPEN SPECIFICATION 35 17 456 A1)

Example 1

The starting materials, namely

5 gms of microcrystalline fibrinogen ,
2.5 gms of hydroxyapatite of a mean particle size of 5 μ m,
100,000 KI units of aprotenin,
2,000 KI units of antiplasmins, and
200,000 KI units of gentamicin,

were dry-mixed with one another. The obtained pulverulent mixture was, by means of desalted water, brought to a total volume of 20 mL and the formulation was agitated. After agitation has been effected for ca. 1 hour at room temperature, a turbid suspension is obtained.

That suspension is filled into a stable trough of plastic material and of a square base and mixed with 2 mL of a 1 % diazomethane solution. Agitation is continued for another 10 min at room temperature and, further to all this, the formulation is kept calm. The suspension, herewith, gradually becomes a solid one. After ca. 3 to 4 hours, the cross-linking reaction is terminated and a whitish, jelly-like mass is obtained. The entire, originally present amount of water is bound within the network. That jelly-like, already largely dimensionally stable mass is

dialysed with regard to an aqueous thrombin solution overnight in order to introduce an accretion factor into the border zone. For this purpose, ca. 9,000 NIH units of "topostasin" are dissolved in 20 mL of water, filled into an appropriate vessel, and the cubic, cross-linked mass is suspended into said vessel in such a way that all surfaces will be covered with solution. From a back calculation of the thrombin still present in the solution after dialysis treatment, it was determined that from ca. 20 to 30 % of the thrombin have been anchored in the border zone of the cross-linked mass.

After an enrichment with the accretion factor, the cross-linked, jelly-like mass was compacted. For this purpose, the mass was placed anew into the trough of plastic material, mechanical pressure was exerted on the exposed surface by means of a fresh tablet of clay, and the mass was compressed with a leakage of water. The mass was turned over and pressure was successively exerted on each surface of the cube. The tablets of clay were exchanged for fresh ones after they became soaked with water.

After ca. 3 hours, that first step of compacting was terminated. The partially compacted cube now already largely dry per se was cut into 6 cuboids of approximately equal size. Each cuboid was individually put into a mould having an adapted mould cavity and covering a free main surface with a sieve of plastic material and an adapted die was placed thereupon. This unit was, further to all this, inserted into a lever-operated press and further compacted by exertion of manual force till the lever could practically not be moved any further.

The finish-compacted, moulded bodies were withdrawn from the mould and freeze-dried under common conditions. The subsequently obtained, moulded bodies were of solid nature and had a slightly yellowish, bone-like appearance. On these samples, the following qualities were determined.

Density:

Determination of the density according Process A as per DIN 53 479 yielded a value of ca. 1.1 g/cm³.

Hardness:

Determination of Shore D hardness as per DIN 53 505 yielded a value of ca. 80.

Bending test:

The bending test was conducted, following DIN 53 452 with application of a load at 3 points.

Sample dimensions: length 38.2 mm, width 7.55 mm,
thickness 4.0 mm

Support distance: 30 mm

Speed of load

application: 3 mm/min

Herewith, a bending strength of ca. 34 N/mm², a bending expansion of ca. 1.6 %, and a bending E elongation of ca. 2,000 N/mm² were detected.

Compression test:

The compression test was conducted, following DIN 53 454, on two smaller sections of ca. 7 mm length. The speed of load application amounted to 0.1 mm/min. The detected measuring results suggest a compressive strength of from ca. 10 to 15 N/mm², an upsetting, in case of rupture, of ca. 3 %, and a compression E module of from ca. 320 to 460 N/mm².

Example 2:

In essence, the Process according to Example 1 was repeated. In deviation therefrom, a piece was cut from the partially compacted mass obtained after the first compacting stage, which piece, after final compaction in an adapted mould, showed the approximate dimensions of a jaw crown fragment. After having been freeze-dried, that fragment was mechanically finished up (carved and filed) and adapted to the Patient's jaw crown defect as exactly as possible. The fine-machined jaw crown fragment was sterilised and then implanted in the Patient's jaw. The bone substitute material was accepted by the organism without rejection or inflammation reaction. According to that empirical knowledge, the resorption rate depends solely on the extent of compacting.

Example 3:

In essence, the Process according to Example 1 was repeated. In deviation therefrom, fibrinogen was replaced by an identical amount of albumin. The cross-linking reaction proceeds without the slightest hitch just as in case of a cross-linking of fibrinogen. The colour of the finished product is somewhat more yellowish. The finished bone substitute material is somewhat crumblier and may be used e. g. for plastic maxillary sinus pieces because a snug fit can easier be attained by a simple break-off.

Example 4:

In essence, the Process according to Example 1 was repeated. In deviation therefrom, a mixture of plasma proteins was employed, namely dry plasma predominantly comprising albumin, globulin, and fibrinogen. The finished bone substitute material is not as mechanically stable as is the material obtained according to Example 1.

1
2
3
4

Example 5:

In essence, the Process according to Example 1 was repeated. In deviation therefrom, 300 mgms of chondroitin sulphate (Na salt) bought from FLUKA Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm, were added to the Formulation. The results of the bending test suggest somewhat higher values.

Patent Claims:

1. Bone substitute material
substantially comprising a matrix of cross-linked plasma protein, in which
matrix calcium phosphate particles are homogeneously distributed,
characterised in that
the material constitutes a solid, mechanically machinable, moulded body of a
density of at least 0.6 gm/cm^3 .
2. Bone substitute material according to Claim 1,
characterised in that
the material is of a thickness of at least 0.8 gm/cm^3 .
3. Bone substitute material according to Claim 1 or 2,
characterised in that
the material is of a Shore D hardness of at least 40.
4. Bone substitute material according to one of Claims 1 to 3,
characterised in that
the material is of a bending strength of at least 20,
preferably of at least 25 N/mm^2 .
5. Bone substitute material according to one of Claims 1 to 4,
characterised in that,

for one part by wt of plasma protein, 0.2 to 1.2 parts by wt of calcium phosphate particles are present.

6. Bone substitute material according to one of Claims 1 to 5,
characterised in that
fibrinogen, fibronectin, albumin, and/or globulin serve as a plasma protein.
7. Bone substitute material according to one of Claims 1 to 6,
characterised in that
fibrinogen serves as a plasma protein.
8. Bone substitute material according to one of Claims 1 to 7,
characterised in that
the material additionally contains one or several fibrinolysis inhibitor(s).
9. Bone substitute material according to one of Claims 1 to 8,
characterised in that
the material additionally contains one or several accretion factor(s).
10. Bone substitute material according to one of Claims 1 to 9,
characterised in that
the material additionally contains one or several glycosamine glycan(s).
11. Process for preparing a bone substitute material, in which case plasma protein, calcium phosphate particles, and, possibly, selectively provided additives are homogeneously distributed in an aqueous or predominantly aqueous solvent; the resulting suspension is mixed with a cross-linking agent, a cross-linking reaction is performed, and the finally obtained material will be deep-frozen, freeze-dried, mechanically machined in case of need, sterilised and quite soon implanted or stored,

characterised in that
the jelly-like mass obtained after cross-linking is compacted.

12. Process according to Claim 11,
characterised in that

mechanical pressure is exerted on the jelly-like mass obtained after
cross-linking in order to squeeze solvent therefrom and reduce the volume
of the mass.

13. Process according to Claim 11 or 12,
characterised in that

mechanical pressure is exerted on the jelly-like mass obtained after cross-
-linking in order to squeeze solvent therefrom and reduce the volume to
at least half the mass volume after cross-linking.

14. Process according to one of Claims 11 to 13,

in which case 15 to 30 parts by wt of plasma protein have been distributed
in 100 parts by wt of solvent,

characterised in that

mechanical pressure is exerted on the jelly-like mass obtained after cross-
-linking for so long till the volume of the cross-linked mass has – under leakage
of liquid – been reduced to about 1/2 to 1/5 of the starting volume.

15. Process according to one of Claims 11 to 14,

characterised in that

mechanical pressure is exerted on the jelly-like mass obtained after cross-linking
for so long until – under usual conditions – no further liquid can be squeezed from
the cross-linked mass anymore.

16. Process according to one of Claims 12 to 15,

characterised in that

2
3
4

a mechanical pressure of about 10 to 30 bars is exerted on the jelly-like mass obtained after cross-linking.

17. Process according to one of Claims 11 to 16,
characterised in that

mechanical pressure exertion is effected by means of a die of movable nature
and of fine-pored material.

18. Process according to one of Claims 11 to 17,
characterised in that
diazomethane is used as a cross-linking agent.

19. Process according to one of Claims 11 to 18,
characterised in that
the jelly-like mass obtained after cross-linking reaction is dialysed with regard to
an accretion factor solution and that, subsequently, compaction will be effected.

100